

改変型S-ヒドロキシニトリルリアーゼを用いた光学活性シアノヒドリン合成技術の開発



市毛栄太 (1)



四十九俊彰 (2)

遠藤眞智子 (3)

北村邦昭 (4)

(1) 株式会社日本触媒 (2), (3), (4) NITE

ヒドロキシニトリルリアーゼは、アルデヒド、ケトン等のカルボニル化合物と青酸から光学活性なシアノヒドリンを生成する反応を触媒する酵素である。光学活性シアノヒドリンはヒドロキシカルボン酸、アミノアルコール、アミノ酸類などへ誘導することができ(図1) 抗菌剤、降圧剤、抗腫瘍剤などの医薬品合成中間体として有用である。

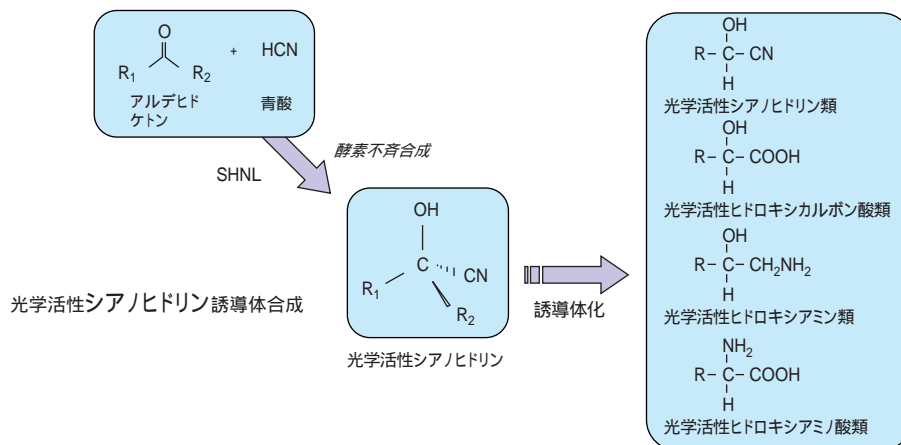


図1 S-ヒドロキシニトリルリアーゼを用いた光学活性シアノヒドリン誘導体生産の概要

しかしながら天然型のS-ヒドロキシニトリルリアーゼ(SHNL)は酵素反応条件下での安定性が不十分であり、工業規模で使用するためには、より安定な酵素の開発が望まれていた。またSHNLは植物体に僅かに含まれるのみであるため、遺伝子組換え菌による大量生産方法の確立が必須であった。そこで我々は、競争力の高い酵素生産プロセスの開発を目指し、1.耐熱性に着目した、改変SHNLの開発、2. SHNL高生産株の構築、および高生産培養条件の確立による、大量生産法の開発を行った。

-1. 耐熱化SHNLの開発

一般に耐熱性酵素は通常の酵素に比べ物理化学的安定性に優れているといわれている。そこで酵素の安定性を向上させるためのアプローチとして、SHNLを耐熱化することとした(図2)。本検討は、独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)及び、京都大学今中研究室との共同研究として実施した。

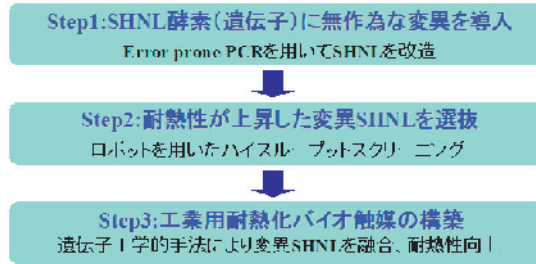
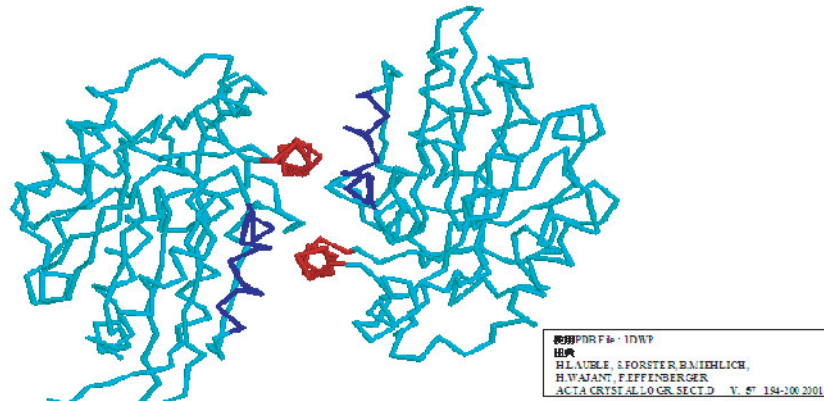


図2 耐熱化SHNL開発戦略の概要

はじめにerror prone PCRによってSHNL遺伝子にランダムな変異を導入し、未変異酵素に対し有為に熱安定性の向上した変異遺伝子を選抜した。選抜された耐熱化変異酵素遺伝子の配列解析の結果、変異箇所がSHNLのダイマー形成部位付近に集中していることが明らかとなった(図3)。



図中赤:ヘリックスD3' 青:ヘリックスA 共にダイマー形成部位

図3 SHNLのダイマー形成部位

この結果から、変異導入によりダイマー形成部位に新たな結合、相互作用が生じたため、モノマー同士の結合が安定化したことにより耐熱性が向上したと考えられた。

それぞれの変異部位のアミノ酸を最適化し、更に最適化した部位を1つの遺伝子上に複合することで、耐熱性を相加的に向上させることができた。現在のところ10以上の耐熱化に成功している(図4)。

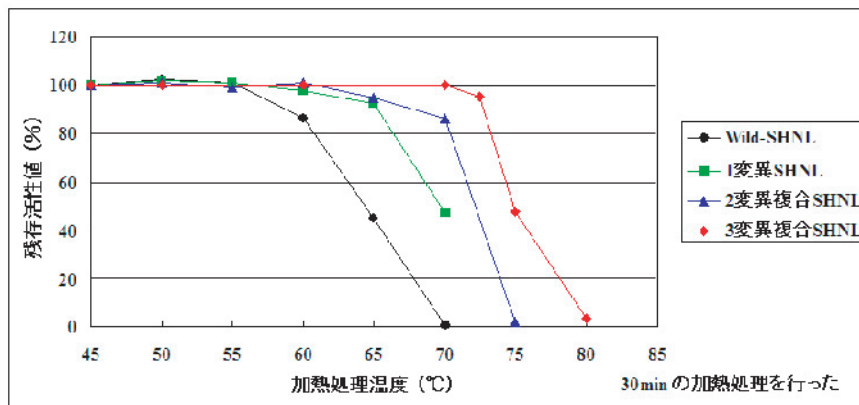


図4 変異箇所の複合が耐熱性に及ぼす影響

本検討で開発した耐熱化SHNLはアルコール、酢酸エチル等の有機溶媒に対する耐性も向上していることがわかった。これらの結果から耐熱性と有機溶媒耐性等の環境ストレスに対する耐性には相関があることが示された。本耐熱化SHNLは組換え大腸菌により生産することができ、菌体破砕物を加熱すると大腸菌由来のタンパク質のみを選択的に不溶化できるため容易に精製できた。このことは酵素の大量生産プロセスにおいて非常に有利である。(図5)。

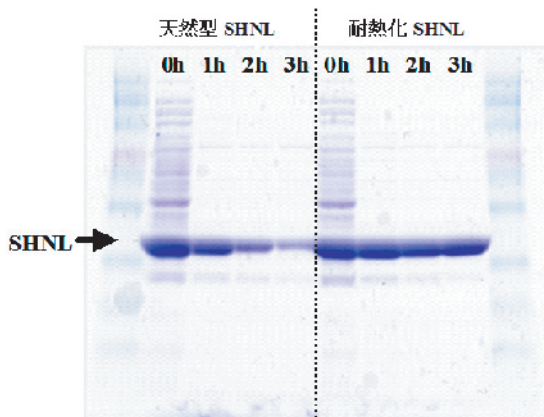


図5 熱処理によるSHNLの精製

本耐熱性SHNLを用いて光学活性シアノヒドリン合成を実施したところ、期待通りに反応の安定性が向上した。また変異導入による立体選択性の低下は生じなかった。

-2 S-ヒドロキシニトリルリアーゼ大量生産法の開発

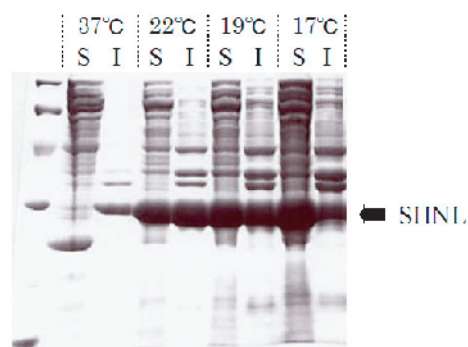
天然型SHNL遺伝子が大腸菌に組換えて発現試験を実施したところ、十分なSHNLの生産性を得ることができなかった。そこで、SHNL高生産株の構築及び高生産培養条件の検討によるSHNL大量生産法の開発を行うこととした。

・SHNL高生産株の構築

SHNL遺伝子が大腸菌体内で効率よく発現させるための方策として、遺伝子配列中のレアコドンの改変を行った。公開されている大腸菌のコドン使用率情報を元に、使用頻度が低いコドンをより高頻度のものへ変更した配列をデザインし、大腸菌型SHNL遺伝子を全合成した。この合成遺伝子での発現を行った結果、SHNLの生産性は3倍程度に向上した。しかしSDS-PAGE解析の結果、生産されたSHNLのほとんどが不溶性画分に存在していることが分かった。この結果から、実際にはコドン改変により顕著にSHNL生産性が向上しているものの、そのほとんどが封入体として生産されていることが示された。従って、封入体の形成を抑制する方法を見出すことにより、更なるSHNL生産性の向上が期待された。

・高生産培養方法の開発

培養条件の最適化からSHNL生産性向上を図るため、培養温度の検討を行った。培養温度を通常よりも低く設定し培養を行ったところ、SHNL活性が大幅に増加した。SDS-PAGE解析の結果から、培養温度を下げたことで可溶型のSHNLの割合が増加していることが分かった。培養温度を更に下げることによって可溶型のSHNLの割合は大きく増加する傾向を示し、17℃では、ほとんどが可溶型のSHNLであることがわかった(図6)。この結果から、低温で培養することにより、生産された酵素のフォールディングが正常に行われ、活性型のSHNLの割合が増加していると考えられた。



S; Soluble fraction, I; Insoluble fraction

図6 培養温度が封入体形成に及ぼす影響

本低温培養では封入体形成が抑制されるばかりでなく、菌体収量も大幅に増加することがわかった。低温下での培養では、代謝速度が低下する。従って酸素消費速度が低下することにより酸素供給律速になりがちな培養系がより長期間好気的環境に保たれ、栄養源が好気的に代謝された結果、菌体収量が増加したと考えられた。本検討の結果、低温培養法は高活性な菌体を高密度で培養できる優れた方法であり、単位培養液当りのSHNLの生産性を飛躍的に増加させることができた(図7)。

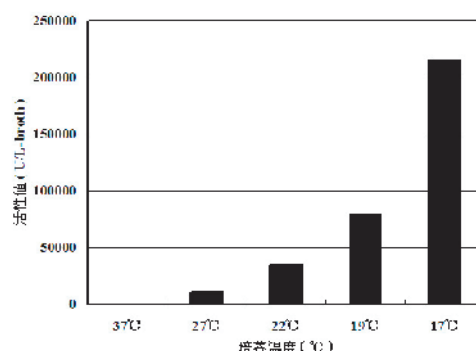


図7 低温培養法によるSHNL生産性の向上

まとめと展望

我々は天然型SHNLの耐熱化改変を行うことにより、安定かつ精製の容易な耐熱性SHNLの開発に成功した。更にコドンの改変と低温培養法によるSHNL大量生産法を構築することができた。本検討で得られた成果は現在実用化研究段階にあり、光学活性シアノヒドリン誘導体合成プロセスへ応用していく予定である。酵素触媒は優れた反応選択性を有する触媒として化学工業への応用が大いに期待されている。しかし触媒調製コストが高い上に耐久性が低いという弱点があり、膨大な種類の酵素反応が知られている割に実用化されている例は少ない。本成果はSHNLの生産ばかりでなく他の酵素への適用も可能であると考えられ、未使用酵素の化学工業への利用促進に寄与できると期待される。



今中 忠行

工学博士、京都大学工学研究科教授